

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
16. September 2004 (16.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/078216 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 48/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000321

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. Februar 2004 (17.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 10 196.9 6. März 2003 (06.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RINA NETZWERK RNA-TECHNOLOGIEN GMBH [DE/DE]; Takustrasse 3, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NEUKAMM, Birgit [DE/DE]; Mittenwalder Strasse 29, 10961 Berlin (DE). LANG, Christine [DE/DE]; Goethestrasse 59, 10625 Berlin (DE). GESSNER, Reinhard [DE/DE]; Furtwänglerstrasse 1, 14193 Berlin (DE).

(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A TRICYCLIC ANTIDEPRESSANT DRUG FOR PROMOTING ENDOCYTOSIS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES TRIZYKLISCHEN ANTIDEPRESSIVUMS ZUR FÖRDERUNG DER ENDOZYTOTOSE

(57) Abstract: The invention relates to the use of a tricyclic compound for promoting the endocytotic uptake of macromolecular active compounds.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt die Verwendung einer trizyklischen Verbindung zur Förderung der endocytotischen Aufnahme makromolekularer Wirkverbindungen.

WO 2004/078216 A2

Verwendung eines trizyklischen Antidepressivums zur  
Förderung der Endozytose.

Gebiet der Erfindung.

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Förderung der Endozytose einer Wirkverbindung, insbesondere eines Konstrukts enthaltend eine Nukleinsäure oder  
10 bestehend hieraus, beispielsweise im Rahmen einer Gentherapie oder der Transfektion von Säugerzellen. Die Erfindung betrifft desweiteren Verfahren zur Förderung der Endozytose und Zellen, welche mit einem solchen Verfahren transformiert sind.

15

Hintergrund der Erfindung.

Bei verschiedensten therapeutischen Ansätzen ist es notwendig, Wirkverbindungen mit hohen Molekulargewichten einzusetzen. Einige Beispiel werden folgend kurz erläutert.  
20

Die Gentherapie ist eine vielversprechende Methode zur Heilung von einer Vielzahl von Krankheiten, die durch  
25 einen keimbahngängigen oder somatischen Gendefekt hervorgerufen werden, wie Erbkrankheiten und Krebs (Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1999; 16(2): 147-207). Bei der Gentherapie werden Nukleinsäuren in die Zielzelle eingebracht, die dort den Defekt direkt beheben sollen. In den  
30 letzten Jahrzehnten wurden mehrere Verfahren zur Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle entwickelt. Dazu zählt das Einbringen von Nukleinsäuren in die Zelle mittels viraler Vektoren, die Lipofektion und die gerichtete

Aufnahme mittels rezeptorvermittelter Endozytose, wie z. B. die Transferrinfektion. Die Nachteile viraler Systeme gegenüber den restlichen Systemen wurden in den letzten Jahren immer deutlicher, so daß die Zukunft der Gentherapie wahrscheinlich in der Benutzung anderer Systeme liegt. Dieses ist ein Verfahren, das sich der natürlichen Endozytosemechanismen der Zelle bedient. Die Transferrinfektion beruht auf dem natürlichen Transferrin-Transferrinrezeptor-Endocytose-System, das die Eisenversorgung in proliferierenden, differenzierenden und Hämoglobin-synthetisierenden humanen Zellen gewährleistet (Theil, E.C., Aisen, P. (1987) The storage and transport of iron in animal cells. Iron transport in Microbes, Plants, Animals, pp. 491-520, Winkelmann, G., van der Helm, D. und Neilands, J.B. (Herausgeber), VCH, Weinheim). Beim Transferrinfektionssystem wurde das natürlich vorkommenden Transferrin-Transferrinrezeptor-Endozytosesystem modifiziert, indem die DNA an den Liganden Transferrin gekoppelt wurde (E. Wagner et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:226-231). Der Ligand bindet spezifisch an den Zelloberflächenrezeptor der Zielzelle und wird durch Endozytose aufgenommen. Um die negative Ladung der DNA zu neutralisieren, die DNA zu kondensieren und sie somit einer Aufnahme zugänglich zu machen, werden Polykationen wie Polyethylenimin oder Polylysin eingesetzt. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß auch kondensierte DNA, die an keinen Liganden gekoppelt ist, endocytotisch aufgenommen wird (W.T. Godbey et al., 1996, PNAS 96:5177-5181) und dieses System wird als Polyfektion beschrieben. Für eine gentherapeutische Nutzung der bisher entwickelten Systeme zum zielgerichteten Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen durch Endozytose ist jedoch die Aufnahme rate, Stabilisierung der DNA vor Degradation in den

zelleigenen Kompartimenten und Transfereffizienz an den Wirkungsort (Cytosol oder Kern) unzureichend (Mahato RI (1999) Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. J Drug Target. 7(4):249-68).

5

- Neben der Gentherapie gibt es weitere Behandlungsansätze und Nutzung meist makromolekularer Nukleinsäuren. Ein erster Ansatz besteht in der Einschleusung von direkt translatierbarer RNA in eine Zielzelle, wobei dann ein  
10 durch die RNA codierter Wirkstoff durch die zelleigenen Mechanismen exprimiert wird. Mittels Antisense RNA, RNA-Aptameren, siRNA und Ribozymen können in einer Zelle aufgrund von Fehlfunktionen, Mutationen, etc. natürlicherweise ablaufenden Prozesse auf RNA-Ebene  
15 moduliert werden. Auch in diesen Zusammenhängen ist die Nutzung und Modulation bzw. Förderung natürlicher Endozytoseprozesse erforderlich, damit die Nukleinsäure in ausreichend großer Menge in die Zelle eingeschleust wird.
- 20 Entsprechendes gilt für andere nieder- und/oder makromolekulare Moleküle in therapeutischen Zusammenhängen, die nur schwer oder gar nicht die Membranbarriere überwinden können und im Komplex mit Proteinen, Nukleinsäuren oder synthetischen Makromolekülen mittels Endozytose in die  
25 Zelle aufgenommen werden können. Hierzu gehören insbesondere alle Medikamente, die im Plasma in ionisierter Form vorliegen und für die kein geeignetes zelluläres Transportsystem existiert. Weiterhin ist es wünschenswert, ein Verfahren zur Verfügung zu haben für die Aufnahme von  
30 lipophilen Pharmaka, die eine hohe Eiweissbindung aufweisen und nach in vitro Bindung an ein geeignetes Carrier-Protein oder ein anderes geeignetes Makromolekül

über Endozytose in die Zielzelle aufgenommen werden können.

Auch können in vitro transfizierte Zellen ihrerseits zu  
5 therapeutischen Zwecken genutzt werden. Beispielsweise  
können einem Patienten Tumorzellen entnommen, in vitro  
kultiviert und gezielt gentechnisch verändert werden,  
beispielsweise mit einer Expressionskassette für ein Gen,  
das eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen stimuliert.  
10 Diese veränderten Zellen können dann dem Patienten wieder  
dargereicht werden und können dann in dem Patienten Immun-  
reaktionen auslösen, die sich gegen die nicht modifizier-  
ten Tumorzellen des Patienten richten. So wird ein  
patienten- und tumorspezifischer Tumoringfstoff erhalten.

15

Bei dem Einsatz onkolytischer Viren werden spezielle Viren  
einem an Krebs erkrankten Organismus dargereicht. Diese  
Viren haben die Eigenschaft, zwar grundsätzlich alle Zel-  
len zu infizieren, sich jedoch ausschließlich in Tumorzel-  
20 len zu vermehren und in diesen Tumorzellen Zelllyse  
auszulösen. In gesunden Zellen ruhen diese Viren dagegen.  
Bekannt ist beispielsweise der Einsatz modifizierter Her-  
pes Simplex Viren (HSV) zur Behandlung von Gehirntumoren.

25 Insbesondere in therapeutischen Anwendungen stellt sich  
also das grundsätzliche Problem, die Wirkverbindung aus  
dem extrazellulären Raum in die Zelle hinein und aus den  
endocytotischen Kompartimenten in das Cytosol zu trans-  
portieren, i.e. Endozytose zu bewirken, oder eine natürli-  
30 cherweise stattfindende Endozytose zu verstärken, damit  
weniger Wirksubstanz benötigt wird bzw. Transfektionsraten  
ausreichend sind. Der Begriff der Endozytose bezeichnet im  
Rahmen dieser Beschreibung allgemein die Aufnahme von

extracellulärem, korpuskulärem oder gelöstem, meist makromolekularem Material in eine Zelle. Makromolekular meint Verbindungen mit einem Molekulargewicht oberhalb von 300 da, vorzugsweise von oberhalb 500 da, höchstvorzugsweise von oberhalb 1000 da. Zu den natürlicherweise aufnehmbaren Makromolekülen gehören beispielsweise Antikörper, Enzyme, Antigen-Antikörper-Komplexe, Lipoproteine, LDL, Transferrin und Nukleinsäuren. Natürlicherweise aufnehmbare korpuskuläres Material umfaßt beispielsweise Viren, Bakterien und Protozoen. Unter anderem im Rahmen gentherapeutischer Maßnahmen, aber auch bei der Nutzung von direkt translatierbaren RNA-Molekülen oder als Antisense-RNA, Ribozyme, siRNA oder RNA-Aptamere wirkenden Nukleinsäuren (einschließlich nicht-natürliche Derivate wie PNA) müssen die makromolekularen Nukleinsäuren zumindest als ersten Schritt in das Cytosol aufgenommen, ggf. auch weiter in den Kern transportiert werden. Methoden und Hilfsstoffe, wie bei den im Rahmen der pharmazeutischen Industrie bislang favorisierten niedermolekularen Wirkstoffe sind hierfür ungeeignet. Vielmehr müssen die natürlichen Endozytosemechanismen genutzt und die Transportrate von der Zellmembran bis zum Wirkort durch geeignete Hilfsstoffe auf ein brauchbares Niveau angehoben werden.

Solche Hilfsstoffe sind Substanzen, die auf einen oder mehrere Schritte der Endozytose die Transportrate erhöhend einwirken bzw. diese modulieren. Bekannt ist der Einsatz von Quinolinringstrukturen, wie Chloroquin, als die Endozytose fördernde Substanz. Hierzu wird lediglich beispielsweise auf die Literaturstelle B. Neukamm et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1572:67-76 (2002), sowie die darin genannten Zitate verwiesen. Weiterhin ist

bekannt der Einsatz von Phenathiazinen, wie Chlorpromazin, zur Förderung der Endozytose.

Aus anderen Zusammenhängen sind trizyklische Substanzen  
5 bekannt, wie beispielsweise Desipramin oder Amoxapin. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Antidepressiva.

Technisches Problem der Erfindung.

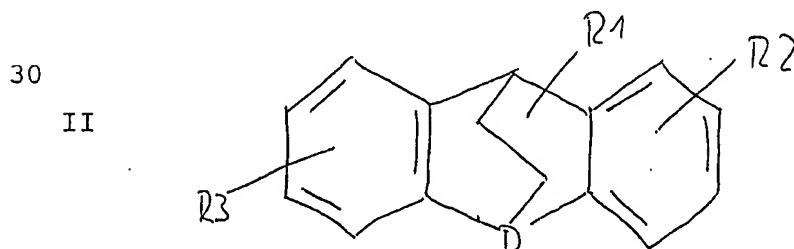
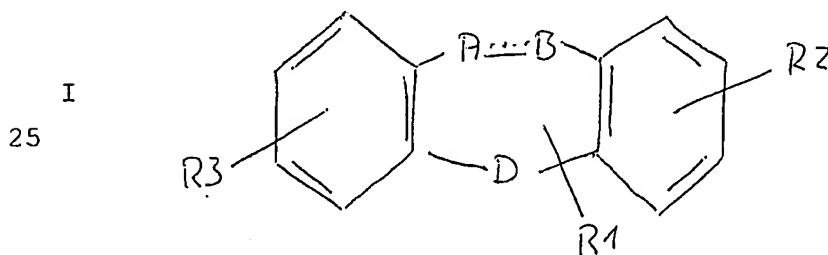
10

Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Mittel anzugeben, welche die Endozytose makromolekularer Wirkverbindungen verbessern.

15

Grundzüge der Erfindung und Ausführungsformen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung die Verwendung einer Substanz gemäß Formel I oder II oder  
20 mehrerer verschiedener solche Substanzen



wobei A, B und D gleich oder verschieden und jeweils ein C-, N-, S-, oder O-Atom sind, wobei ..... eine Einfach- oder Doppelbindung ist, wobei freie Valenzen mit -H gebunden sind, wobei R1 einfach, zweifach oder dreifach vorhanden und -H, -C1-15-Alkyl (verzweigt, linear oder zyklisch), oder -C1-15-Alkyl (verzweigt, linear oder zyklisch) mit einem oder mehreren C-Atomen substituiert durch O, S oder N ist, wobei R2 und R3 gleich oder verschieden, jeweils und unabhängig voneinander einfach, zweifach, dreifach oder vierfach vorhanden und -H, oder -Hal sind, wobei -Hal = -F, -Cl, oder -Br, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Förderung der Endocytose von Wirkverbindungen. Im Falle von R1 mit substituiertem C-Atom oder mehreren substituierten C-Atomen zählt das O-, S- bzw. N- Atom im Rahmen des Begriffes C1-15-Alkyl als C-Atom. Beispielsweise wäre ein Rest R1 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub> in dieser Terminologie C5-Alkyl, wobei ein C-Atom durch ein N-Atom substituiert ist.

20

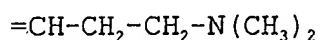
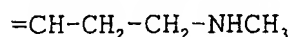
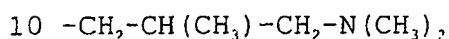
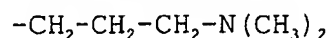
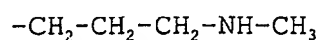
Eine Substanz ist die Endozytose fördernd, wenn die Substanz beispielsweise in einem Transfektionsexperiment, wie in den Beispielen angegeben, höhere Transfektionsraten bzw. Effizienzen bewirkt im Vergleich zum gleichen Experiment, nur mit Einsatz des Puffers (Negativkontrolle). Das Maß der Förderung ist in gleicher Weise bestimmbar und vergleichbar, wenn die Auswertegrösse quantitativ bestimmt wird, absolut, relativ zu einer Negativkontrolle oder relativ zu einer definierten die Endozytose fördernden Referenzsubstanz.

30



Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass sogenannte trizyklische Antidepressiva eine die Endozytose fördernde Wirkung haben.

5 Im einzelnen kann die Substanz die folgenden bevorzugten Strukturmerkmale aufweisen. R1 kann ein sekundäres oder tertiäres Amin sein. Bevorzugte Beispiele für R1 sind:



1-Piperazinyl.

R1 kann insbesondere nur einfach vorhanden und an D gebunden sein, wobei im Falle der Formel II D ein C-Atom sein kann. .... kann eine Einfachbindung sein. A und B können C-Atome und D ein C- oder N-Atom sein. Alternativ können A ein C-Atom, B ein O-Atom und D ein C-Atom sein. R2 und R3 können insbesondere -H sein. A kann ein N-Atom, B ein C-Atom und D ein O-Atom sein, wobei .... eine Doppelbindung ist. R2 kann einfach vorhanden und -Hal sein, und wobei R1 = -H ist.

Beispiele für geeignete Substanzen sind: Desipramin, Imipramin, Trimipramin, Amitriptylin, Nortriptylin, Doxepin, Amoxapin, Maprotylin und andere trizyklische Antidepressiva.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung von selbstständiger Bedeutung ist dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich eine Quinolinderivatverbindung und/oder eine Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

"Chloroquin, Chlorpromazin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", enthält. Eine Variante dieser Ausführungsform umfasst generell die Verwendung einer Mischung aus zumindest zwei verschiedenen Substanzen  
5 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "die Endocytose fördernde Quinolinringverbindungen und/oder eine Phenathiazinverbindungen, die Endozytose fördernde Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 9" zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend eine von den Sub-  
10 stanzen verschiedene Wirkverbindung mit einem Molekulargewicht grösser als 300. Diese Ausführungsformen der Erfindung beruhen auf der Erkenntnis, dass eine solche Kombination von bekannten die Endozytose fördernden Substanzen mit erfindungsgemäß neu eingesetzten Substanzen,  
15 aber auch ausschließlich von bereits bekannten die Endozytose fördernden Substanzen, zu synergistischen Effekten führt. Überraschenderweise werden Transfektionsraten erzielt, die erheblich über jenen liegen, die mit den jeweiligen Substanzen allein erreichbar sind. Diese Er-  
20 läuterungen gelten insbesondere auch hinsichtlich der zweitgenannten Variante auch für die folgend dargestellten Aspekte der Erfindung.

Es ist auch möglich, sogenannte Triple- oder Multikombinationen mit drei oder mehr verschiedenen der vorstehend  
25 diskutierten Substanzen einzusetzen.

Alternativ oder zusätzlich zur Kombination mit der im vorstehenden Absatz genannten Gruppe kann auch mit einem ein  
30 Alkylpolyamin kombiniert werden. In Frage kommen Alkylpolyamine mit Molekulargewichten zwischen 100 und 50.000. Bevorzugterweise sind die Alkylpolyamine linear. Weiterhin bevorzugt haben die Polyamine eine oder zwei primäre

Amingruppen. Aber auch verzweigte Alkylpolyamine ggf. mit mehr primären Amingruppen sind grundsätzlich einsetzbar.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann im Prinzip jede  
5 Wirkverbindung enthalten, deren Einschleusung in eine Zelle wünschenswert ist. In einem wesentlichen Einsatzgebiet enthält die Wirkverbindung ein Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, in Mischung mit den erfindungsgemäß eingesetzten  
10 Substanzen oder in separater Darreichungseinheit hierzu und zur gemeinsamen Anwendung bestimmt. In letzterem Falle können die Darreichungseinheiten zugleich oder nacheinander, in beiden möglichen Reihenfolgen, dargereicht werden.

15

Eine definierte Sequenz ist eine ausgewählte und vorgebene bekannte Sequenz. Das Konstrukt kann mehrere solcher Sequenzen enthalten. In letzterem Falle können die mehreren Sequenzen auch unterschiedlich sein, insbesondere  
20 beispielsweise Varianten einer Sequenz sein, innerhalb welcher gezielt Teilsequenzen randomisiert sind. Eine solche Randomisierung kann 1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 4, miteinander verbundene oder nicht miteinander verbundene Nukleotide betreffen. Randomisierung meint, dass eine ran-  
25 domisierte Nukleotidposition ein beliebiges der 4 verschiedenen Nukleotide aufweisen kann.

Die Erfindung lehrt desweiteren die Verwendung einer erfindungsgemäß eingesetzten Substanz oder mehrerer ver-  
30 schiedener solcher Substanzen, optional in Mischung mit einer Quinolinringverbindung und/oder eine Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin,

Phenathiazin und Chlorpromazin", zur Förderung der Endozytose einer Wirkverbindung, insbesondere eines Konstruktes enthaltend eine Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, wobei die Zelle in vitro mit der  
5 Wirkverbindung sowie der Substanz inkubiert wird.

Die Erfindung lehrt weiterhin ein Verfahren zur transienten oder stabilen Transfektion einer Zelle in vitro, wobei die Zelle mit einem Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure  
10 definierter Sequenz oder bestehend hieraus, sowie einer erfindungsgemäß eingesetzte Substanz oder mehrerer verschiedener solcher Substanzen, optional in Mischung mit einer Quinolinringverbindung und/oder einer Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend  
15 aus "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", inkubiert wird, wobei die Substanz die endocytotische Aufnahme der Nukleinsäure in die Zelle (Endozytose) bewirkt, und wobei die Nukleinsäure die Zelle gelangt und dort ihre Wirkung entfaltet (z.B. die  
20 Zelle transfiziert). Dabei kann das Konstrukt ein Markergen enthalten, oder die Inkubation kann mit einem zweiten Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure codierend für ein Markergen oder bestehend hieraus durchgeführt werden.  
Diese Variante erlaubt leichte Kontrolle der Transfektion  
25 durch Detektion des Expressionsproduktes des Markergens (z.B. GFP, Luciferasemessung).

Schliesslich lehrt die Erfindung eine stabil oder transient transfizierte Zelle erhältlich indem eine Zelle mit  
30 einem Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, sowie einer erfindungsgemäß eingesetzten Substanz oder mehrerer verschiedener solcher Substanzen, optional in Mischung mit einer

Quinolinringverbindung und/oder einer Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", inkubiert wird, wobei die Substanz die  
5 endocytotische Aufnahme des Konstruktes bewirkt, und wobei die Nukleinsäure die Zelle transfiziert.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise  
10 erfolgen. Als Gegenionen für ionische Substanzen und/oder Wirkverbindungen kommen beispielsweise  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  oder Cyclohexylammonium infrage. Insbesondere Amine können als Hydrochlorid vorliegen. Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granu-  
15 late, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe,  
20 Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler Verwendung finden. Als Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose  
25 und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss- oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische  
30 Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, dass mindestens eine erfindungsgemäß verwendete Substanz in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten

Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen gemischt und zu der gewünschten Darreichungsform hergerichtet wird.

Die Erfindung ist in den verschiedensten Bereichen anwend-  
5 bar. Zielzellen, in vitro oder in vivo, können grundsätzlich alle primären Zellen eines Organismus sein, beispielsweise somatische pluripotente Zellen oder T-Zellen, sowie alle Zelllinien zur Verwendung in in-vitro Experimenten. Beispielsweise im Falle der T-Zellen sind  
10 die erfindungsgemäß verwendeten Substanzen vorteilhaft gegenüber Chloroquin. Besondere Anwendungen liegen beispielsweise in der Gentherapie, der Generierung von Organismen, wie Labortiere, für bestimmte Versuchszwecke, aber auch in der Transplantationsmedizin, wobei Lagerungs-  
15 schäden der Zellen der zu transplantierenden Organe verhindert bzw. repariert werden können und/oder wobei die Organe in ihrem Immunverhalten so verändert werden können, dass Abstossungsreaktionen im Körper des Empfängers nicht stattfinden.

20

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen sowie Vergleichsbeispielen näher erläutert.

25

Beispiel 1: Wirksubstanz enthaltend eine Nukleinsäure  
(Testform)

Zum Zwecke der Messung der die Endozytose fördernden  
30 Wirkung erfindungsgemäßer Substanzen wurde als Modell-Wirksubstanz das folgend beschriebene Plasmid eingesetzt. Verwendet wurde das Plasmid pFL1, wie beschrieben in der Literaturstelle D. Botstein et al., Gene 8:17-24 (1979).

pFL1 ist ein 2 µm zirkuläres Plasmid für *Saccharomyces cerevisiae* (Sa) mit einer hohen Kopieanzahl. Es enthält als selektiven Marker für *ura3* auxotrophe Hefestämme das Sa Gen URA3 sowie Teile des pBR322 *E. coli* Plasmids für  
5 die Replikation und Selektion in *E. coli*. Das Plasmid wurde in *E. coli* SF8 gehalten und mit dem Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt.

Für Luciferase Zellkultur Assays wurde das Luciferasegen  
10 mit NotI (NEB) in pBlueskript SK (+) (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) geklont, und zwar unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und einem SV40 poly-A-Signal. Dieses Plasmid wurde in *E. coli* DH5α amplifiziert. Die DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit gereinigt.

15

## Beispiel 2: Modell-Zellsysteme

### 2a: Hefesystem

20

Ein erstes Zellsystem ist ein Hefesystem. Das Transfektionsprotokoll entsprach jenem der Literaturstelle B. Neukamm et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1572:67-76 (2002). Für die Messungen wurde ein Laborroboter (Zinsser,  
25 Frankfurt, Deutschland) eingesetzt und ein Pipettierungsprotokoll wurde erstellt.

Hefe Vorkulturen wurden aus Kulturen eines -70°C Glycerol Vorrates des Stammes RPY10 (R.C. Piper et al., *Eur J Cell Biol* 65:305-318 (1995) für 72 Stunden gezogen. In der  
30 Hauptkultur wurden die Zellen über Nacht in YPD Medium bis zu einer Zelldichte von 5 bis 8 \* 10<sup>7</sup> Zellen/ml gezogen. 12 \* 10<sup>9</sup> Zellen wurden geerntet und zweimal mit dem gleichen

Volumen destillierten Wassers gewaschen. Die Zellen wurden durch Einweichen in destilliertem Wasser für 30 Minuten bei 4°C kompetent für die Transfektion gemacht. Die kompetenten Zellen wurden geerntet und in 10 ml 34% Sucrose, 5 eingestellt auf pH 4 mit HCl, resuspendiert. Die Suspension wurde umgehend in sterilisierte 40 ml Glassröhrchen (Zinsser Analytik, Frankfurt, Deutschland) übertragen, welche dann mit Aluminiumfolie verschlossen wurden. Die Röhrchen wurden dann auf einen Schüttler auf der Plattform 10 des Laborroboters plaziert und für 40 Sekunden bei 300 UpM behandelt. Die Suspension wurde automatisch in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte verteilt (je 80 µl unter Verwendung von Edelstahlspitzen).

15 Das anschliessende Pipettierungsprotokoll war wie folgt. Zunächst wurden Lösungen einer erfindungsgemäßen Substanz oder einer Vergleichssubstanz mit verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Exakt 5 Minuten später wurden 10 µl einer Lösung bzw. Suspension des pFL1 Plasmids (0,15 20 µg/µl) aus Beispiel 1 automatisch zu der Mischung aus Zellen und Substanz gegeben. Einige Wells wurden zur Negativkontrolle verwendet, wobei lediglich die verwendeten Lösungsmittel und das Plasmid zur Zellsuspension zugegeben wurden, nicht jedoch Substanz. Nach Beendigung des Pipet- 25 tierungsprotokolls wurde die Platte abgedeckt und auf den Desyre-Mixer plaziert (Zinsser Analytik). Nach Vortexen für 1 Minute bei 1300 UpM erfolgte eine Inkubation bei 28°C für 18-20 Stunden. Nach der Inkubation wurden jeweils 110 µl destilliertes Wasser langsam zugegeben. Dann wurden 30 die Zellen jeder Vertiefung auf 6-well Platten (PS-Macroplate, Greiner) transferriert, mit 4 ml WMIXura (Neukamm et al, s.o.) Medium aufgefüllt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 50 µl destilliertem



Wasser gewaschen und die Waschlösung wurde auf die feste Oberfläche des WMIXura pipettiert. Die Macroplates wurden trocknen gelassen und 4 Tage bei 28°C inkubiert.

5 Kolonie-bildende Einheiten (cfu) wurden dann in jeder Vertiefung gezählt. Die erhaltenen cfu-Werte wurden in das Verhältnis zu den cfu-Werten der Negativkontrolle gesetzt. Dieser Quotient ist ein Maß für die Transfektionseffektivität.

10

#### 2b: Säugerzellen System

HepG2 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium  
15 (DMEM, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland), supplementiert mit 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco) und 1 µg/ml Insulin, gezogen. Am Tag 1 wurden die Zellen mittels Trypsinierung abgelöst, gewaschen und auf die Vertiefungen einer 24-wells Gewebekulturschale aufgeteilt, und zwar 1,5  
20 \* 10<sup>5</sup> Zellen je Vertiefung.

Ca. 24 Stunden später wurden die Transfektionsversuche mit dem Luciferase Plasmid aus Beispiel 1 und mit verschiedenen Substanzen bei ca. 70 bis 80% Konfluenz durchgeführt. Dazu wurde der Überstand entfernt und dann eine  
25 Mischung (250 µl) enthaltend Medium, 12,5 µl Dextran (10 mg/ml), 0,5 µl des Plasmids und die jeweilige Substanz zu jeder Vertiefung zugegeben. Nach 2,5-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand entfernt und wurden 500 µl  
30 Kompletmedium zu jeder Vertiefung zugegeben. Am Tag 5 wurde die Luciferase-Aktivität unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay System Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) gemessen. Hierzu wurden 48 Stunden nach der

Transfektion die Zellkulturüberstände entfernt und die Zellen nach Zugabe von 100 µl 1x Lysis Puffer je Vertiefung (Promega) für 20 Minuten bei 20°C auf einem langsamen Schüttler solubilisiert. 20 µl des zellfreien Überstand  
5 wurden in eine 96-well Platte (Corning und Costar, Wiesbaden, Deutschland) transferiert und mit 100 µl Luciferase Assay-Puffer versetzt. Die Luciferaseaktivität wurde mit einem Luminometer (EG&G Berthold MicrolumatPlus) gemessen.

10

#### Beispiel 3: Bestimmung der optimalen Konzentrationen

Für jede eingesetzte Substanz wurde mittels Konzentrationsreihen die optimale Konzentration bestimmt. Hierzu  
15 wurden Konzentrationsreihen der jeweiligen Substanzen eingesetzt. Zum Vergleich sind entsprechende Messungen mit Chloroquin durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in den Figuren 1a (Hefesystem) und 1b (Säugerzellensystem) angegeben. Die Ordinatenwerte sind auf Chloroquin norm-  
20 iert. Man erkennt, dass im Falle der Substanzen Amoxapine, Desipramine, Maprotiline und Chlorpromazine die optimalen Konzentrationen niedriger als im Falle von Chloroquin liegen. Grundsätzlich sind im Hinblick auf Nebenwirkungen möglichst geringe Konzentrationen wünschenswert und  
25 vorteilhaft. Lediglich im Falle von Doxepine ist die optimale Konzentration ähnlich hoch wie bei Chloroquin.

#### Beispiel 4: Mischungen von Substanzen

30

In der Figur 2 sind Experimente mit Mischungen von erfindungsgemäß eingesetzten Substanzen dargestellt. Hierbei wurde jeweils mit optimalen Konzentrationen, wie in

Beispiel 3 bestimmt, gearbeitet. CQ steht für Chloroquin. Man erkennt im Falle der Mischungen von Chloroquin mit erfindungsgemäßen Substanzen durchgehend drastisch erhöhte Luciferaseaktivität, verglichen mit dem Einsatz von

5 Chloroquin allein. Eine vergleichende Betrachtung mit der Figur 1b zeigt, dass auch gegenüber dem Einsatz der erfindungsgemäßen Substanzen allein drastisch erhöhte Werte erhalten werden. Insgesamt führt also der Einsatz von solchen Mischungen zu einer erheblichen Verbesserung der

10 Transfektionseffizienz, woraus sich allgemein eine erhebliche Verbesserung der Förderung der Endozytose ergibt.

#### Beispiel 5: Dosierungen

15

Unabhängig von den vorstehenden Ausführungsbeispielen sind typische einsetzbare Dosen der erfindungsgemäß verwendeten trizyklischen Antidepressiva im Bereich von 1 bis 200 mg je Tag (Erwachsener mit 75 kg Körpergewicht), vorzugsweise

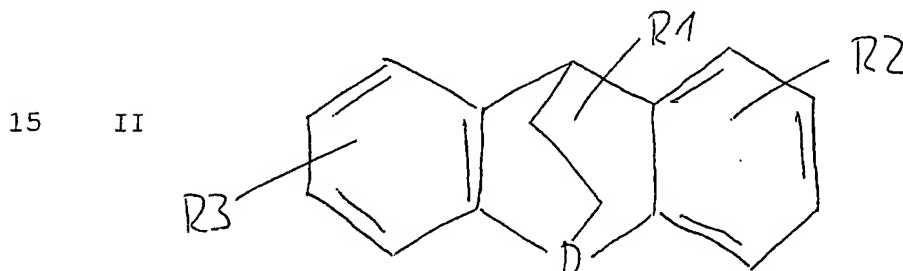
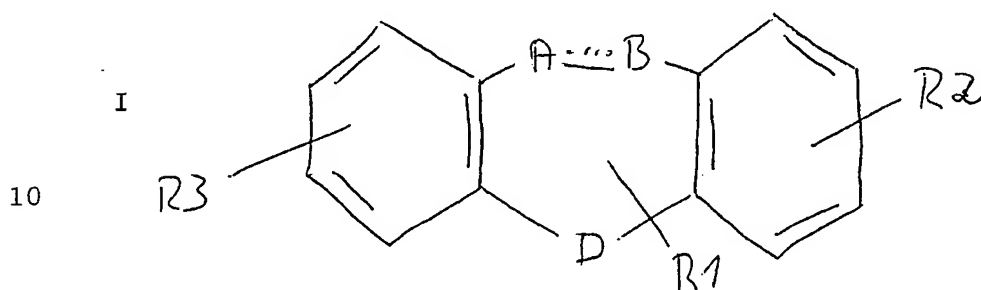
20 30 bis 120 mg. Die Menge der Wirksubstanz in einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung richtet sich nach den für die Wirksubstanz üblichen Dosen. Vorzugsweise sind die Dosen der Wirksubstanz gleich oder kleiner den Dosen, die ohne Gabe der erfindungsgemäß verwendeten üblich sind. Die

25 Dosen können um bis zu 90% und mehr reduziert werden.

## Patentansprüche:

1. Verwendung einer Substanz gemäß Formel I oder II oder  
mehrerer verschiedener solche Substanzen

5



wobei A, B und D gleich oder verschieden und jeweils  
ein C-, N-, S-, oder O-Atom sind,

20

wobei ..... eine Einfach- oder Doppelbindung ist,

wobei freie Valenzen mit -H gebunden sind,

25

wobei R1 einfach, zweifach oder dreifach, im Falle der  
Formel II auch bis zu vierfach, vorhanden und -H,  
-C1-15-Alkyl (verzweigt, linear oder zyklisch, gesättigt oder ungesättigt), oder -C1-15-Alkyl (verzweigt,  
linear oder zyklisch, gesättigt oder ungesättigt) mit  
einem oder mehreren C-Atomen substituiert durch O oder  
N ist,

30

wobei R1 im Falle, dass A, B und/oder D in Formel I ein C-Atom ist, mit einer Einfach- oder einer Doppelbindung an ein solches C-Atom gebunden sein kann,

- 5      wobei R2 und R3 gleich oder verschieden, jeweils und unabhängig voneinander einfach, zweifach, dreifach oder vierfach vorhanden und -H, oder -Hal sind, wobei -Hal = -F, -Cl, oder -Br,
- 10     zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend eine von der Substanz bzw. den Substanzen verschiedene Wirkverbindung mit einem Molekulargewicht grösser als 300.
- 15
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei R1 ein sekundäres oder tertiäres Amin ist.
- 20 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei R1 einfach vorhanden und an D gebunden ist, wobei im Falle der Formel II D ein C-Atom ist.
- 25 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei .... eine Einfachbindung ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei A  
30      und B C-Atome sind und D ein C- oder N-Atom ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei A ein C-Atom, B ein O-Atom und D ein C-Atom ist.
- 5 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei R2 und R3 -H sind.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei A  
10 ein N-Atom, B ein C-Atom und D ein O-Atom ist, und wobei .... eine Doppelbindung ist.
9. Verwendung nach Anspruch 9, wobei R2 einfach vorhanden  
15 und -Hal ist, und wobei R1 = -H ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich eine die  
20 Endocytose fördernde Quinolinringverbindung und/oder eine Phenathiazinverbindung oder mehrere verschiedene solcher Verbindungen, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", enthält.  
25
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung die Wirkver-  
bindung, insbesondere ein Konstrukt enthaltend eine  
30 Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, in Mischung oder in separater Verpackungseinheit enthält.

12. Verwendung einer Substanz gemäß einer der Ansprüche 1 bis 9 oder mehrerer verschiedener solcher Substanzen, optional in Mischung mit einer die Endocytose  
5 fördernden Quinolinringverbindung und/oder eine Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", zur Förderung der Endozytose einer Wirkverbindung, insbe-  
10 sondere eines Konstruktes enthaltend eine Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, wobei die Zelle in vitro mit der Wirkverbindung sowie der Substanz inkubiert wird.
- 15
13. Verfahren zur transienten oder stabilen Transfektion einer Zelle in vitro, wobei die Zelle mit einem Kos-  
trukt enthaltend eine Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hieraus, sowie einer Substanz nach  
20 einem der Ansprüche 1 bis 9 oder mehrerer verschiedener solcher Substanzen, optional in Mischung mit einer die Endozytose fördernde Quinolinringverbindung und/oder einer Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
25 "Chloroquin, Primazin, Quinin, Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", inkubiert wird, wobei die Substanz die Endozytose der Nukleinsäure bewirkt, und wobei die Nukleinsäure die Zelle transfiziert.
- 30
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Konstrukt ein Markergen enthält, oder wobei die Inkubation mit einem zweiten Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure

codierend für ein Markergen oder bestehend hieraus durchgeführt wird.

5 15. Stabil oder transient transformierte Zelle erhältlich  
indem eine Zelle mit einem Konstrukt enthaltend eine  
Nukleinsäure definierter Sequenz oder bestehend hi-  
eraus, sowie einer Substanz nach einem der Ansprüche 1  
bis 9 oder mehrerer verschiedener solcher Substanzen,  
10 optional in Mischung mit einer die Endozytose  
fördernden Quinolinringverbindung und/oder einer  
Phenathiazinverbindung, optional ausgewählt aus der  
Gruppe bestehend aus "Chloroquin, Primazin, Quinin,  
Biquinolin, Phenathiazin und Chlorpromazin", inkubiert  
15 wird, wobei die Substanz die Endozytose des Konstruk-  
tes bewirkt, und wobei die Nukleinsäure die Zelle  
transformiert.

20 16. Verwendung einer Mischung aus zumindest zwei ver-  
schiedenen Substanzen ausgewählt aus der Gruppe beste-  
hend aus "die Endocytose fördernde Quinolin-  
ringverbindungen und/oder Phenathiazinverbindungen,  
Alkylpolyamine, und die Endozytose fördernden Substanz  
25 nach einem der Ansprüche 1 bis 9" zur Herstellung  
einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend eine  
von den Substanzen verschiedene Wirkverbindung mit  
einem Molekulargewicht grösser als 300.



1/3

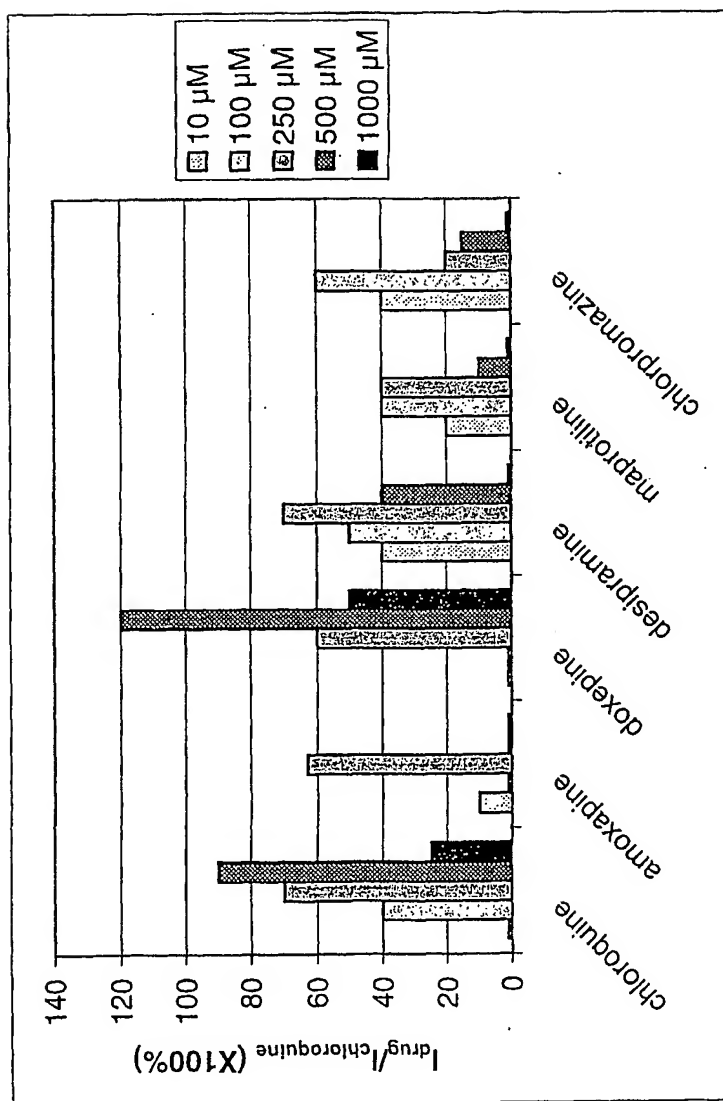


Fig. 1a

2/3

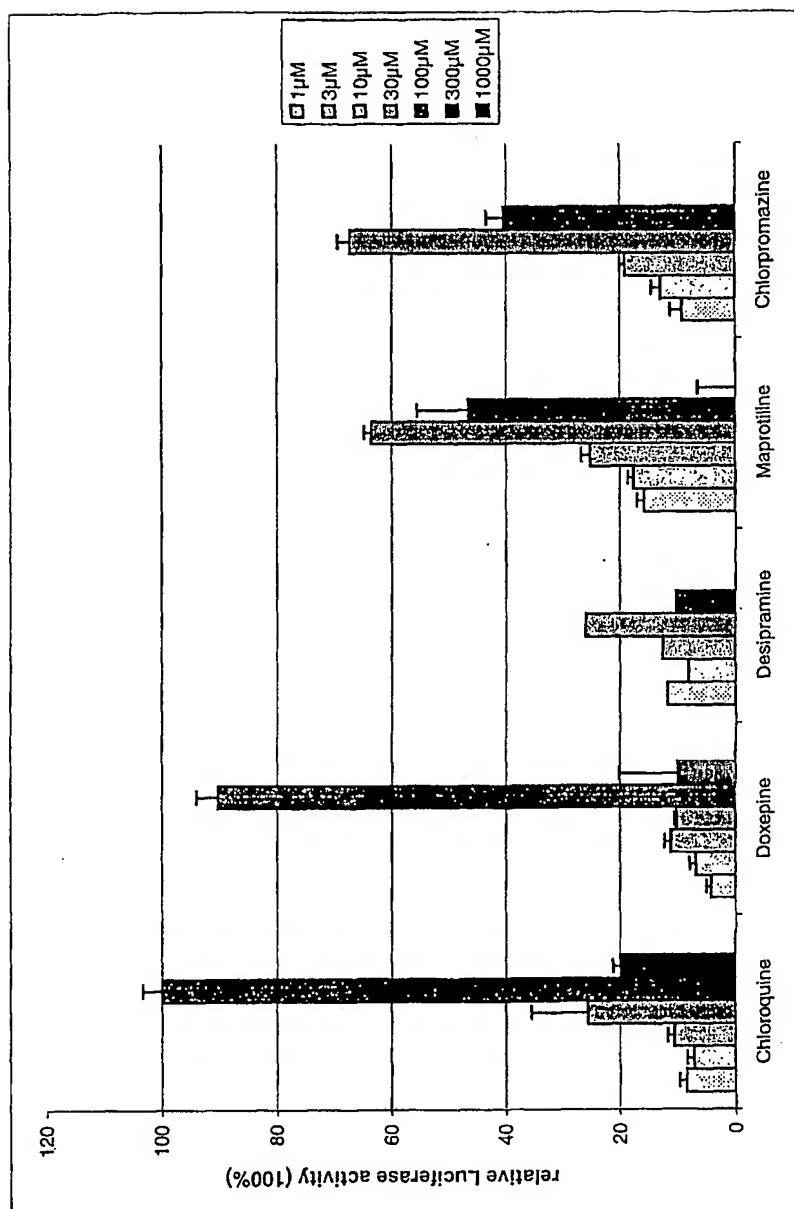


Fig. 1b

3/3

